Maisons-Alfort, le 12 novembre 2012

LE DIRECTEUR GENERAL

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande de renouvellement d'homologation de la préparation bactérienne pour soja BIODOZ SOJA STABILISE, à base de *Bradyrhizobium japonicum*, de la société NOVOZYMES BIOLOGICALS

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de matières fertilisantes et supports de culture.
Les avis formulés par l'Agence comprennent :
- *l'évaluation des risques sanitaires que l'utilisation de ces produits peut présenter pour l'homme, l'animal ou l'environnement ;*
- *l'évaluation de leur efficacité sur les végétaux ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;*
- *une synthèse de ces évaluations assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.*

PRESENTATION DE LA DEMANDE

L'Agence a accusé réception d'une demande de renouvellement d'homologation au titre des matières fertilisantes du produit BIODOZ SOJA STABILISE de la société Novozymes Biologicals France, pour laquelle, conformément à l'article R.255-1-1 du Code rural et de la pêche maritime, l'avis de l'Anses est requis.

Le produit bénéficie d'une homologation N° 9010018 depuis le 20 avril 1990, arrivée à échéance le 31 décembre 2010. Selon les termes de cette autorisation, ce produit est de la classe « Préparation bactérienne pour soja » et du type « Inoculum de *Bradyrhizobium japonicum* ».

Le présent avis porte sur la préparation bactérienne BIODOZ SOJA STABILISE à base de *Bradyrhizobium japonicum*, souche G49, fixée sur un support de tourbe naturelle stérilisée. La souche G49 est la seule souche de *B. japonicum* autorisée en France.

Cet avis est fondé sur l'évaluation par l'Agence du dossier déposé à l'Anses pour cette préparation microbienne, conformément aux exigences du Code rural et de la pêche maritime, de l'arrêté du 21 décembre 1998 et du guide pour l'homologation des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (document cerfa 50644#01) et sous réserve de l'utilisation du produit dans le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA).

SYNTHESE DE L'EVALUATION

Les données prises en compte sont celles qui ont été jugées valides par l'Anses. L'avis présente une synthèse des éléments scientifiques essentiels qui conduisent aux recommandations émises par l'Agence et n'a pas pour objet de retracer de façon exhaustive les travaux d'évaluation menés par l'Agence.

Après évaluation de la demande, réalisée par la Direction des produits réglementés avec l'accord d'un groupe d'experts du Comité d'experts spécialisé "Matières Fertilisantes et Supports de Culture", l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

CONSIDERANT L'IDENTITE DU PRODUIT

Le produit BIODOZ SOJA STABILISE est obtenu à partir d'un inoculant biologique à base de *Bradyrhizobium japonicum*, souche G49, fixé sur un support de tourbe naturelle stérilisée. La souche G49 est la seule souche de *B. japonicum* autorisée en France.

Les caractéristiques garanties du produit sont les suivantes (sur produit brut) :

Caractéristiques	Valeurs garanties selon la décision d'autorisation de mise sur le marché en vigueur	Valeurs garanties selon la déclaration du pétitionnaire
Matière Sèche	-	57,5%
Nom de la souche	*Bradyrhizobium japonicum* G49	*Bradyrhizobium japonicum* G49
Nombre de germes	1.10^9 par gramme	1.10^9 par gramme (minimum)
Quantité pour 400000 graines (1 hectare)	400 g	0,4 $kg.ha^{-1}.apport^{-1}$, 1 apport par an

Les effets revendiqués par le pétitionnaire concernent la fixation de l'azote atmosphérique ainsi que l'augmentation du rendement.

Ce produit est proposé pour une utilisation en enrobage de semences pour les usages présentés ci-dessous. Il se présente sous forme de poudre (sachet de 400 g) et doit être mélangé avec 0,75 L d'eau avant l'enrobage des semences.

Usages et conditions d'emploi demandés :

Culture	Dose par apport (en $kg.ha^{-1}$)	Quantité de microorganismes (par ha)	Nombre d'apport par an	Epoque d'apport
Soja	0,4 (un sachet)	4.10^{11} ufc	1	Semis

La dose maximale d'apport prise en compte pour l'évaluation de l'innocuité du produit est de 400 g par hectare et par an.

CONSIDERANT LES DEMANDES DE SUIVI POST-HOMOLOGATION

Les éléments de suivi post-homologation requis étaient les suivants, conformément à la décision d'homologation datée du 10 octobre 2001 :

Compléments requis	Délai accordé	Date de fourniture	Commentaires
Résultats des contrôles effectués sur chaque lot avant commercialisation	6 mois avant l'échéance de l'autorisation	16/12/2010	Complet

Les résultats révèlent une richesse en *Bradyrhizobium japonicum* supérieure aux exigences de l'homologation pour l'ensemble des lots produits ainsi qu'une absence de contaminants.

CONSIDERANT LE MODE DE FABRICATION DU PRODUIT ET LA QUALITE DE LA PRODUCTION

Caractérisation du produit et procédé de fabrication

Les spécifications du produit telles que décrites sur le formulaire cerfa 11385 (arrêté du 21/12/98, annexe I) et la fiche d'information permettent de caractériser ce produit.

La préparation bactérienne est obtenue par une culture pure de *Bradyrhizobium japonicum* en fermenteur en conditions stériles, imprégnée de tourbe en sachet stérile. Chaque lot de commercialisation correspond à un emballage contenant 20 sachets de 400 g de produit.
Le système de management de la qualité de la fabrication est décrit de manière satisfaisante. Les souches de *Bradyrhizobium japonicum* G49 sont vérifiées chaque année quant à leur pureté, leur richesse en colonies et leurs propriétés de nodulation et de fixation d'azote par le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon. Par ailleurs, chaque lot commercialisé est contrôlé conformément à la dernière décision d'homologation. La vérification des inocula avant commercialisation porte sur le poids, l'humidité, le pH, la pureté microbiologique (absence de contaminants décelables) et le titre en *Bradyrhizobium japonicum* revivifiables. La conservation est également vérifiée sur un lot pris au hasard, en utilisant les échantillons disponibles parmi ceux reçus pour les contrôles de qualité, et qui ont été stockés à température ambiante. Cette vérification se fait par dénombrement et contrôle de pureté. Le pétitionnaire précise que les conditions de qualité requises pour qu'un lot soit commercialisable sont d'être fabriqué avec la souche G49, avoir une richesse en *Bradyrhizobium japonicum* revivifiables au moins égale à 4.10^{11} par sachet, et d'être exempt de contaminants décelables.

Les attestations croisées de fourniture et d'approvisionnement sont présentées de manière exhaustive pour ce qui concerne les sources de matières premières indiquées dans le dossier technique pour lesquelles ces documents sont requis. Toute autre provenance correspondrait à un changement de composition et nécessiterait une évaluation complémentaire.
La souche *Bradyrhizobium japonicum* G49 n'est pas manipulée génétiquement. Par ailleurs, les matières premières, ainsi que le procédé de fabrication, ne présentent pas de dangers physico-chimiques particuliers.

Constance de composition du produit

La constance de composition du produit relative à la richesse en germes est convenablement établie.

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse

La méthode d'échantillonnage utilisée dans le cadre du dossier technique pour constituer les échantillons soumis à l'analyse n'est pas décrite mais ne présente pas d'enjeu important dans le cas des cultures microbiennes.

L'analyse de caractérisation a été effectuée par un laboratoire accrédité sur le programme 108.
Les analyses relatives aux contrôles de la souche bactérienne et des inocula ont été réalisées par le Centre de Microbiologie du Sol et de l'Environnement, à INRA de Dijon. Les méthodes ont été communiquées et jugées acceptables. Par ailleurs, les critères d'identification des souches microbiennes sont moléculaires. La méthode utilisée par le laboratoire de l'INRA est une méthode reconnue, publiée et utilisée en routine par le laboratoire de l'INRA de Dijon qui contrôle tous les inocula de *Bradyrhizobium* mis sur le marché en France depuis de nombreuses années.

Il est rappelé que, aux écarts admissibles près, la conformité de chaque unité de commercialisation du produit aux teneurs garanties sur l'étiquette est requise, et que ces écarts admissibles ne peuvent pas être exploités de manière systématique.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'INNOCUITE DU PRODUIT

Matières premières et procédé de fabrication

L'espèce *Bradyrhizobium japonicum* n'est pas pathogène pour l'homme ou l'animal. Elle n'est pas inscrite sur la liste à l'annexe III de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail.
Selon un rapport de l'OCDE[1] consacré à la sécurité relative à l'utilisation des microorganismes en tant que biofertilisants, de rares cas d'allergie ont été signalés en présence de grande quantité de *rhizobiums*.

La souche G49 est la seule souche de *B. japonicum* autorisée en France. *Bradyrhizobium japonicum* est un symbiote non strict, c'est-à-dire que ce microorganisme peut survivre dans le sol en l'absence de plante hôte. Les rhizobia ont un potentiel de persistance à long terme dans les sols et peuvent entrer en compétition avec les microorganismes indigènes. Néanmoins, la population introduite persiste dans une faible proportion et ainsi la population indigène retrouve son niveau initial (OCDE, 1995).
Par ailleurs, compte tenu de l'usage du produit (traitement de semences), le transfert de la souche G49 vers les milieux aquatiques n'est pas attendu.

La tourbe stérilisée, support de l'inoculum bactérien, ne représente pas de danger particulier pour l'homme et l'environnement. L'analyse microbiologique réalisée sur le produit fini est en cohérence avec une hygiénisation correcte de la tourbe.

Etude toxicologique du produit fini

Les teneurs en éléments traces métalliques (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) permettent de respecter les critères d'innocuité pour l'homologation des matières fertilisantes dans les conditions d'emploi préconisées.
Par ailleurs, les analyses microbiologiques effectuées montrent que le produit respecte les critères en vigueur pour l'homologation.

Aucun essai de toxicologie réalisé sur le produit n'a été communiqué. Cependant, la souche G49 contenue dans la préparation bactérienne BIODOZ SOJA STABILISE est utilisée depuis plus de vingt ans en France sans qu'aucun effet délétère chez l'homme ou l'animal n'ait été rapporté. De même, les autres composants du produit ne sont pas de nature à engendrer un risque pour l'homme ou l'animal.
Aucune classification toxicologique n'est proposée pour le produit. Néanmoins, s'agissant d'un produit à base de microorganismes, la phrase de précaution « Contient *Bradyrhizobium japonicum*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » doit être mentionnée sur l'étiquette et le port d'un masque anti poussière avec filtre FFP3, de gants et d'un vêtement de protection appropriés est obligatoire pendant toutes les phases du traitement de semences.

Résidus et sécurité du consommateur

Les éléments requis dans les dossiers de demande d'homologation des matières fertilisantes et supports de culture permettent de conduire une évaluation *a priori* pour le consommateur, uniquement pour les contaminants pour lesquels des valeurs de référence ont été déterminées. Ces valeurs de référence pourraient elles-mêmes évoluer à la lumière de données méthodologiques, techniques, scientifiques et réglementaires récentes.

Par ailleurs, les propriétés et caractéristiques du produit fini ne laissent préjuger d'aucun danger spécifique pour le consommateur.

[1] OCDE = Organisation de Coopération et de Développement.

Devenir dans l'environnement et écotoxicité du produit fini

Aucun test d'écotoxicité ni aucun essai visant à mesurer l'impact environnemental du produit BIODOZ SOJA STABILISE n'a été effectué.
Toutefois, la nature des matières premières et du procédé de fabrication ainsi que les données bibliographiques sur le devenir des rhizobia dans l'environnement sont en faveur d'un impact à court terme acceptable sur l'environnement.

Au vu du mode d'apport (traitement de semences), l'impact du produit à court terme sur l'environnement est considéré comme acceptable.

La classification environnementale proposée pour le produit est : non classé.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'EFFICACITE DU PRODUIT

Caractéristiques biologiques du produit

Effets revendiqués

Le produit BIODOZ SOJA STABILISE revendique la fixation de l'azote atmosphérique par symbiose entre les bactéries du genre *Rhizobium* et le soja, permettant une réduction de l'apport d'azote tout en obtenant un rendement supérieur à celui d'une parcelle non inoculée. Le pétitionnaire présente à l'appui de ces revendications une nouvelle expérimentation mise en œuvre dans les conditions d'emploi préconisées par l'INRA de Dijon, en 2002.

Mode d'action et éléments relatifs à l'efficacité intrinsèque

Le mode d'action des bactéries est bien établi et repose sur la colonisation du système racinaire du soja et la formation de nodosités par la bactérie symbiotique *Bradyrhizobium japonicum*.

Essais d'efficacité

L'inoculation des graines de soja en présence du produit conduit à la formation de nodosités sur les racines des plantes et améliore significativement la couleur et le rendement des plantes par rapport au témoin.
Par ailleurs, l'efficacité de *Bradyrhizobium japonicum* pour la fixation de l'azote atmosphérique par le soja est avérée et reconnue.

Conclusions sur le mode d'emploi du produit

Le mode d'emploi indiqué est suffisant pour permettre une bonne utilisation du produit. Le paramètre déclarable sur l'étiquette est le dénombrement des germes de l'inoculum. La souche bactérienne sera également précisée.

Revendications retenues

Les revendications présentées par le pétitionnaire relatives à la fixation de l'azote atmosphérique et à l'augmentation du rendement peuvent être considérées comme soutenues.

CONCLUSIONS

En se fondant sur les données soumises par le pétitionnaire et évaluées dans le cadre de cette demande, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

A. La caractérisation ainsi que la constance de composition du produit BIODOZ SOJA STABILISE sont convenablement établies. L'élément de caractérisation retenu pour le marquage obligatoire est le dénombrement des germes de l'inoculum. La souche bactérienne sera également précisée.

B. L'innocuité du produit BIODOZ SOJA STABILISE pour les usages demandés est considérée comme conforme aux exigences réglementaires.

Classification du produit, phrases de risque et conseils de prudence

Les données disponibles pour ce produit permettent de considérer que le produit est non classé.

Précautions d'emploi

Le port d'un masque anti poussière avec filtre FFP3, de gants et vêtements de protection appropriés est obligatoire pour l'utilisateur pendant toutes les phases du traitement de semences. La mention « Contient B*radyrhizobium japonicum*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » doit figurer sur l'étiquette.

C. L'efficacité du produit BIODOZ SOJA STABILISE est avérée et reconnue.

Usage retenu (en l'état actuel de l'évaluation)

Culture	Dose par apport ($g.ha^{-1}$)	Quantité de microorganismes (par ha)	Nombre d'apport par an	Epoque d'apport
Soja	400	4.10^{11} ufc	1	Semis

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet un avis **favorable** à la mise sur le marché de la préparation bactérienne pour soja BIODOZ SOJA STABILISE et propose un renouvellement d'homologation.

Données post-autorisation

Les compléments d'information suivants devront être apportés au plus tard 6 mois avant l'échéance de l'autorisation de mise sur le marché, sauf indications contraires précisées ci-dessous :

Type	Compléments post-homologation requis
Analyses	Effectuer au moins tous les six mois, sur des échantillons représentatifs du produit tel qu'il est mis sur le marché et selon les méthodes prévues par le programme COFRAC 108 ou spécifiées ci-après, des analyses portant au moins sur : - les éléments figurant sur l'étiquetage (dénombrement des germes) ; - les éléments traces métalliques As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn ; - les microorganismes totaux, Entérocoques, *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, Nématodes, Levures et moisissures, *Aspergillus, Pythium* (méthodes prévues par le guide pour l'homologation). Les analyses doivent avoir été effectuées par un laboratoire accrédité par le COFRAC sur le programme 108 ou par un organisme équivalent (norme NF ISO 17025). Si elles sont réalisées selon une méthode distincte de celles prévues ci-dessus, fournir la méthode utilisée, sa justification et les éléments nécessaires à sa validation. Il conviendrait que le responsable de la mise sur le marché conserve à 4°C pendant les 12 mois suivant la mise sur le marché un échantillon représentatif de chacun des lots, en vue d'éventuelles analyses complémentaires rendues nécessaires par une information tardive sur les matières premières ou un éventuel problème constaté par les utilisateurs du produit.

Marc MORTUREUX

Mots-clés : BIODOZ SOJA STABILISE - *Bradyrhizobium japonicum* souche G49 - tourbe - enrobage de semences - soja